

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 10002875  
PUBLICATION DATE : 06-01-98

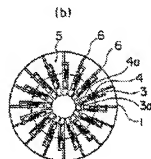
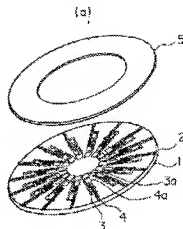
APPLICATION DATE : 14-10-96  
APPLICATION NUMBER : 08271215

APPLICANT : HOUMETSUTO:KK;

INVENTOR : KARUBE MASAO;

INT.CL. : G01N 27/327 G01N 27/28 G01N 27/27

TITLE : ENZYME REACTION SENSOR AND  
MANUFACTURE THEREOF



ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an enzyme reaction sensor with a small size by which glucose concentration existing in blood and urine can be measured many times and provide a manufacturing method for which a semiconductor processing technique with high productivity as its advantage is employed.

SOLUTION: A glucose sensor comprises a silicon substrate 1, a plurality of grooves 2 formed in one surface of the silicon substrate 1, a pair of platinum electrode films 3, 4 formed in a plurality of grooves 2, and a Pyrex glass plate 5. Glucose oxidase as an enzyme is immobilized in the inside of a capillary 6 formed between the grooves 2 and the Pyrex glass plate 5.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-2875

(43) 公開日 平成10年(1998) 1月6日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所	
G 0 1 N	27/327		G 0 1 N	27/30	3 5 3 J
	27/28	3 3 1		27/28	3 3 1 A
	27/27			27/46	A

審査請求 未請求 請求項の数25 O L (全 13 頁)

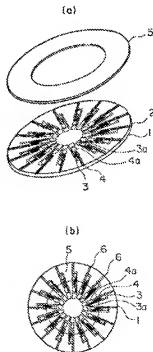
(21) 出願番号	特願平9-271215	(71) 出願人	591086706 萩部 征夫 神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地16
(22) 出願日	平成8年(1996)10月14日	(71) 出願人	596017185 株式会社ホームネット 東京都世田谷区三軒茶屋二丁目14番10号
(31) 優先権主張番号	特願平8-98719	(72) 発明者	萩部 征夫 神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地16
(32) 優先日	平8(1996)4月19日	(74) 代理人	弁理士 後藤 洋介 (外2名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

## (54) 【発明の名称】 酵素反応センサー及びその製造方法

## (57) 【要約】

【課題】 例えば、血液や尿中に存在しているグルコース濃度を小型装置で多数回測定することを可能にし、かつ半導体加工技術の利点である量産性の高いことを利用した酵素反応センサーとその製造方法とを提供すること。

【解決手段】 グルコースセンサは、シリコン基板1と、シリコン基板1の一表面に形成された複数の溝2と、前記複数の溝2に夫々形成された一対の白金電極膜3、4と、前記溝2を覆うバイレックスガラス板5とを備え、前記溝2及びバイレックスガラス板5とによって形成されたキャビラリ6内部に酵素としてグルコースオキシダーゼを固定化した。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 半導体基板と、前記半導体基板の一表面に形成された複数の溝と、前記複数の溝に夫々形成された貴金属からなる一対の電極膜と、前記溝を覆うガラス板とを備え、前記溝及びガラス板とによって形成されたキャビタリー内部に酵素を固定化したことを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項2】 請求項1記載の酵素反応センサーにおいて、前記酵素は、グルコースオキシゲナーゼであることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項3】 請求項1又は2記載の酵素反応センサーにおいて、前記半導体基板は、円形のシリコンウエハーからなり、前記複数の溝は前記シリコンウエハーの一面に半径方向に沿って形成されていることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項4】 請求項1乃至3の内のいずれかに記載の酵素反応センサーにおいて、前記貴金属は白金からなり、前記一対の電極膜は、前記シリコンウエハーの中心寄りに電極取出端部を備えていることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項5】 請求項1乃至4の内のいずれかに記載の酵素反応センサーにおいて、前記ガラス板はバイレックスガラスからなり、前記溝以外の前記ガラス板と前記半導体基板とは互いに接合していることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項6】 マイクロマシン技術を用いて、半導体基板上にエッチングによって、溝を複数形成し、更に、貴金属からなる一対の電極膜を形成し、前記溝を覆うようにガラス板を接合して一体化させて、キャビタリーを形成し、前記キャビタリー内部に、酵素を固定化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項7】 請求項6記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記半導体基板は、円形のシリコンウエハーからなり、前記溝を半径方向に形成することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項8】 請求項7又は7記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記貴金属は白金からなり、前記一対の電極膜は、スパッタリング法、及びバイオンリング法によって、前記シリコンウエハーの中心寄りに電極取出端部を有するように、形成することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項9】 請求項6乃至8の内のいずれかに記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記ガラス板はバイレックスガラスからなり、前記シリコンウエハーとは陽極接合法によって一体化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項10】 請求項6乃至9の内のいずれかに記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記酵素として、グルコースオキシゲナーゼを化学結合・包括法によって固定化することを特徴とする酵素反応センサーの製造

方法。

【請求項11】 一対の互いに重ね合わせられる基板と、前記一対の基板の内の少なくとも一方の基板の一表面に形成された複数の溝と、前記複数の溝に対応して、前記一対の基板の内のいずれかに形成された貴金属からなる少なくとも2個の電極膜とを備え、前記溝及び基板とによって形成されたキャビタリー内部に酵素を固定化したことを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項12】 請求項11記載の酵素反応センサーにおいて、前記酵素は、グルコースオキシゲナーゼであることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項13】 請求項11又は12記載の酵素反応センサーにおいて、前記基板は、円形形状のプラスチックからなり、前記複数の溝は前記プラスチック基板の一面に半径方向に沿って形成されていることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項14】 請求項11乃至13の内のいずれかに記載の酵素反応センサーにおいて、前記貴金属は白金からなり、前記電極膜は、前記プラスチック基板の中心寄りに電極取出端部を備えていることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項15】 請求項11乃至14の内のいずれかに記載の酵素反応センサーにおいて、前記複数の電極膜は3個形成されていることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項16】 請求項11乃至15の内のいずれかに記載の酵素反応センサーにおいて、前記一対の基板は、互いに接合されていることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項17】 請求項11乃至16の内のいずれかに記載の酵素反応センサーにおいて、前記一対の基板は、前記一対の基板は、アブラズ重合膜を接合面に備え、当該アブラズ重合膜の溶接によって互いに接合されていることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項18】 請求項11乃至16記載の酵素反応センサーにおいて、前記酵素固定は、少なくとも前記キャビタリーの内壁面に存在するアミノ基を有するモノマーのアブラズ重合膜の前記アミノ基と前記酵素に存在するアミノ基とを架橋試薬によって結合させたものであることを特徴とする酵素反応センサー。

【請求項19】 マイクロマシン技術を用いて、一枚基板上に溝を複数形成し、更に、他の一枚の基板上に前記溝に対応して貴金属からなる少なくとも一対の電極膜を夫々形成し、前記溝と前記貴金属とを対応させて前記一対の基板を重ね合わせて接合して一体化させて、キャビタリーを形成し、前記キャビタリー内部に、酵素を固定化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項20】 請求項19記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記基板は、円形のプラスチックからなり、前記溝を半径方向に形成することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項21】 請求項19又は20記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記貴金箔は白金からなり、前記一对の電極膜は、スパッタリング法、及びイオンミリング法によって、前記基板の中心寄りに電極取出端部を有するように、形成することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項22】 請求項19乃至21の内のいずれかに記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記基板はアクリル樹脂からなり、互いに接合されて一体化することと特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項23】 請求項19乃至22の内のいずれかに記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記一枚の基板に溝を形成した後、及び前記他の一枚の基板に電極層を形成する前に、前記夫々の基板の互いに接合される面の表面に、アミノ基を含むアラスマ重合膜を形成することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項24】 請求項19乃至23の内のいずれかに記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記酵素として、グルコースオキシダーゼを化学結合・包括法によって固定化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【請求項25】 請求項23記載の酵素反応センサーの製造方法において、前記酵素はアミノ基を備え、前記酵素の固定化は、前記アラスマ重合膜のアミノ基と前記酵素のアミノ基との架橋反応の作用により結合させることを含むことを特徴とする酵素反応センサーの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、臨床用携帯型マルチタイアルコースセンサー等の酵素反応を利用したセンサーに関し、詳しくは、酵素反応を用いて血液中・尿中のグルコース濃度を測定するセンサーと、その製造方法とに関する。

【0002】

【従来の技術】 成人病の一つである糖尿病疾患は1日に数回血糖値を測定し、インスリンの投与のコントロールや、食事のコントロールをしなければならない。現在グルコース測定法としては、比色法・酵素反応法等がある。

【0003】 この比色法としては還元法 (Somogyi-Nelson法) が一般的である。この方法は以下の手順を経て測定される。まず、硫酸亜鉛と水酸化バリウムを使って妨害物である蛋白質を除く(除蛋白)。その後、遠心、ろ過し還元反応・呈色反応を起こさせる。その他の比色法としては縮合法(オートリジン・ホウ酸法)がある。この方法は、糖を酸性条件下、オートリジンとともに加熱すると青緑色を呈することを利用するものである。これら比色定量法は、それぞれ反応物質に特有な波長の吸収光を当てて吸光度を測り、その結果からグルコース濃度を測定する方法である。

【0004】 一方、酵素反応を用いる測定法としては、グルコースオキシダーゼ(GOD)等の酵素を用いてグルコースが反応したときに発生する過酸化水素等の生成物を測定するか、または、減少する物質(酵素)を定量することによって、グルコースを定量する方法がある。実際に検出手段としては、電極を用いる方法(サイクリックボルタアンメトリ)と比色測定法とが存在する。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 比色法は、一般に前処理が必要でありまた分光学的測定法を用いることから検出部が大型になる。また上記したように吸光光度法では、測定物質の固有波長に近似した波長を有する他の物質による影響を受けるため正確な測定値が得られないことがある。

【0006】 一方、現在の酵素法による装置は、酵素の基質選択性を利用することから前処理の必要等はないが多数のサンプルを測定するためにはポンプ、反応槽等の装置を取り付ける必要があり、装置が大型化し低コスト化・量産化が困難となる。また、測定検体のグルコース濃度を即時に検出し、携帯性・多数サンプル測定という条件を満たすには問題が残る。

【0007】 そこで、本発明の技術的課題は、例えば、血液や尿中に存在しているグルコース濃度を小型装置で多数回測定することを可能にし、かつ半導体加工技術の利点である量産性の高いことを利用した酵素反応センサーとその製造方法とを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明は、マイクロシミュレーション技術を用いて円形のシリコンウエハー等の半導体基板上に、例えば、放射状に溝と白金電極膜を多数作製し、その後、半導体基板とバイレックスガラス等のガラス板とを一体化させてキャピラリーを形成させ、内部にグルコースオキシダーゼ等の酵素を固定化する。以上の様にキャピラリー、電極を単一の半導体基板上に多数作製しマルチタイアルコースセンサー等の酵素センサーを構築する事から上記の様な小型化・多数サンプル測定・量産性という課題を解決している。

【0009】 即ち、(1)本発明によれば、半導体基板と、前記半導体基板の一表面に形成された複数の溝と、前記複数の溝に夫々形成された貴金箔からなる一对の電極膜と、前記溝を塞ぐガラス板とを備え、前記溝及びガラス板とによって形成されたキャピラリー内部に酵素を固定化したことを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0010】 また、(2)本発明によれば、前記酵素反応センサーにおいて、前記酵素は、グルコースオキシダーゼであることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0011】 また、(3)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーにおいて、前記半導体基板は、円

形のシリコンエハーからなり、前記複数の溝は前記シリコンエハーの一面に半径方向に沿って形成されていることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0012】また、(4)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーにおいて、前記貴金属は白金からなり、前記一对の電極膜は、前記シリコンエハーの中心寄りに電極取出端部を備えていることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0013】また、(5)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーにおいて、前記ガラス板はパイレックスガラスからなり、前記溝以外の前記ガラス板と前記半導体基板とは互いに接合していることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0014】また、(6)本発明によれば、マイクロマシン技術を用いて、半導体基板上にエッチングによって、溝を複数形成し、更に、貴金属からなる一对の電極膜を形成し、前記溝を覆うようにガラス板を接合し一体化させて、キャピラリーを形成し、前記キャピラリー内部に、酵素を固定化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0015】また、(7)本発明によれば、前記酵素反応センサーの製造方法において、前記半導体基板は、円形のシリコンエハーからなり、前記溝を半径方向に形成することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0016】また、(8)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーの製造方法において、前記貴金属は白金からなり、前記一对の電極膜は、スパッタリング法、及びイオンミリング法によって、前記シリコンエハーの中心寄りに電極取出端部を有するように、形成することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0017】また、(9)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーの製造方法において、前記ガラス板はパイレックスガラスからなり、前記シリコンエハーとは隣接接合法によって一体化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0018】また、(10)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーの製造方法において、前記酵素として、グルコースオキシダーゼを化学結合・包絡法によって固定化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0019】また、(11)本発明によれば、一对の互いに重ね合わせられる基板と、前記一对の基板の内の少なくとも一方の基板の一表面に形成された複数の溝と、前記複数の溝に対応して、前記一对の基板の内のいずれかに形成された貴金属からなる少なくとも二個の電極膜とを備え、前記溝及基板とによって形成されたキャピラリー内部に酵素を固定化したことを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0020】また、(12)本発明によれば、前記酵素反応センサーにおいて、前記酵素は、グルコースオキシダーゼであることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0021】また、(13)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーにおいて、前記基板は、円形形状のプラスチックからなり、前記複数の溝は前記プラスチック基板の一面に半径方向に沿って形成されていることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0022】また、(14)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーにおいて、前記貴金属は白金からなり、前記電極膜は、前記プラスチック基板の中心寄りに電極取出端部を備えていることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0023】また、(15)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーにおいて、前記複数の電極膜は3個形成されていることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0024】また、(16)本発明によれば、前記いずれかの酵素センサーにおいて、前記一对の基板は、互いに接合されていることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0025】また、(17)本発明によれば、前記いずれかの酵素センサーにおいて、前記一对の基板は、前記一对の基板は、アブズマ重合膜を接合面に備え、当該アブズマ重合膜の溶接によって互いに接合されていることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0026】また、(18)本発明によれば、前記いずれかの酵素センサーにおいて、前記酵素固定は、少なくとも前記キャピラリーの内壁面に存在するアミノ基を有するモノマーのアブズマ重合膜の前記アミノ基と前記酵素に存在するアミノ基とを架橋試薬によって結合させたものであることを特徴とする酵素反応センサーが得られる。

【0027】また、(19)本発明によれば、マイクロマシン技術を用いて、一枚基板上に溝を複数形成し、更に、他の一枚の基板上に前記溝に対応して貴金属からなる少なくとも一对の電極膜群を去け形成し、前記溝と前記貴金属とを対応させて前記一对の基板を重ね合わせて接合一体化させて、キャピラリーを形成し、前記キャピラリー内部に、酵素を固定化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0028】また、(20)本発明によれば、前記酵素反応センサーの製造方法において、前記基板は、円形のプラスチックからなり、前記溝を半径方向に形成することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0029】また、(21)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーの製造方法において、前記貴金属は白金からなり、前記一对の電極膜は、スパッタリ

ブ法、及びイオンミリング法によって、前記基板の中心寄りに電極取出端部を有するように、形成することと特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0030】また、(22)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーの製造方法において、前記基板はアクリル樹脂からなり、互いに接合されて一体化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0031】また、(23)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーの製造方法において、前記一枚の基板に溝を形成した後、及び前記他の一枚の基板に電極群を形成する前に、前記夫々の基板の互いに接合される面の表面に、アミノ基を含むアズマ重合膜を形成することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0032】また、(24)本発明によれば、前記いずれかの酵素反応センサーの製造方法において、前記酵素として、グルコースオキシダーゼを化学結合・包括法によって固定化することを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0033】また、(25)本発明によれば、前記酵素反応センサーの製造方法において、前記酵素はアミノ基を備え、前記酵素の固定化は、前記アズマ重合膜のアミノ基と前記酵素のアミノ基との架橋試薬の作用により結合させることを含むことを特徴とする酵素反応センサーの製造方法が得られる。

【0034】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について図面を参照して説明する。本発明の実施の形態においては、酵素反応センサーとして、グルコースセンサの例を示したが、本発明はこれらに限定されるものではないことは明らかである。

【0035】図1(a)は本発明の第1の実施の形態によるグルコースセンサを示す組立分解斜視図。(b)は平面図である。図1(a)及び(b)を参照すると、グルコースセンサ10は集電化センサーデバイスであり、シリコン基板1の一面上には、溝2が半径方向に形成されている。この溝2には、白金電極膜3、4が形成され、バイレックスガラス板5に覆われている。このバイレックスガラス板とシリコン基板1とは、接合され一体化しており、溝2部分はバイレックス板に覆われてキャピラリー6を形成している。このキャピラリー6には、グルコースオキシダーゼが固定化される。

【0036】図1(b)に示すグルコースセンサを次に示す手順で作成した。

【0037】まず、直径2インチ、結晶格子100面、片面鏡面仕上げのシリコンエハー1に対しRCA社の方法に準じた洗浄を行った後、水素熱法での熱酸化で約

0.8オングストロームの酸化膜を形成させた。これにフォトレジストをスピコートしフォトマスクでパターンニングを行い、フッ化水素酸、フッ化アンモニウム溶液で酸化膜のエッチングを行いH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液(エチレンジアミン・ピロカデコール水)のエッチング溶液を用い結晶異方性ウエットエッチング法により長さ12mm、幅1mm、深さ56μmの放射状の溝2を16本作成した。シリコンエハー1は、大気中に放置もしくは、直接加熱することによって、表面に絶縁性を備えた膜が形成されている。この溝2を多層作成したシリコンエハー1全面に対し、スバックリング装置を用いて白金膜を厚さ約200オングストローム形成しフォトレジストをスピコートし、白金膜のパターンニングを行った後イオンミリング装置で、ドライエッチングを行い白金電極膜3、4をそれぞれの溝にそれぞれ1対(2電極)形成させた(単一あたりの電極面積1mm<sup>2</sup>)。さらにこのシリコンエハー1とバイレックス製で外径2インチ内径1.2インチのガラス基板5とを隔壁接合することにより立床構造を形成させた。以上の操作を経て微細管構造キャピラリー6と白金電極膜3、4を成形した。なお、キャピラリーの内部に電極取出部3a、4aがそれぞれ露出して形成されている。

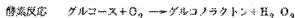
【0038】次に、酵素固定化方法について述べる。酵素としてのグルコースオキシダーゼ(GOD)は、ガラスやシリコン表面をアミノ化し架橋剤にグルカルアルデヒド(GA)を用いてこれを酵素のアミノ基と架橋させる方法で固定化した。製作したキャピラリー6に3-アミノプロピルトリエトキシシラン(aminopropyltriethoxysilane, γ-APTES)のトルエン溶液10μlを室温で通過させ夜115℃に加熱した。2.5%(v/v)のグルカルアルデヒド(GA)を含むリン酸緩衝液(pH7.1)でカラムを満たし1時間保持し、これを排出後リン酸緩衝液を通過させて洗浄し、1.0%(w/v)のGOD(Type II, Sigma)を含むリン酸緩衝液でカラムを満たし終夜保持し内部に、グルコースオキシダーゼを固定化した。

【0039】次に、本発明の第1の実施の形態によるグルコースセンサの測定原理について説明する。

【0040】本発明の第1の実施の形態によるマルチアブグルコースセンサは、グルコース溶液および検査試料を毛細血管現象によりシリコンエハー先端のキャピラリー6から内部に導入される。導入されたグルコース溶液は、キャピラリー内部で固定化されたGODの触媒作用により下記反応1式に示すように、グルコラクトンと過酸化水素に変換される。

【0041】

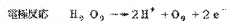
【化1】



【0042】生成した過酸化水素はキャピラリー内の白金電極膜で、下記化学式の電極反応に従って電気化学的に検出される。

【0043】

【化2】



【0044】電気化学検出は、酸素や過酸化水素など多くの酵素反応の基質や生成物が電気化学的に活性でありそれぞれの化学種は電気化学的に分別定量可能でありこれらの電気化学検出が有効な測定デバイスになる。また一般的に、分光学的検出での検出対象がサイズの3乗に比例して減少していくのに対して、電気化学検出ではサイズの2乗に比例して減少する。本発明によるグルコースセンサを用いた検出法では、電気化学検出法を採用しているため、微小化に伴い相対的に電気化学検出法の効率が高くなる。更に微小化により試薬や試料の消費量を抑えることができる。すなわち測定時間の短縮を図ることができる。生成した過酸化水素は白金電極膜の片方の電極—アノード電極により酸化されアノード電流が観測される。以上のことから過酸化水素濃度の電流値変化を観測することからグルコースの定量が可能となった。

【0045】次に、本発明の第1の実施の形態によるグ

ルコースセンサを用いたグルコースの測定例について説明する。

【0046】GODを用いてグルコースを測定するとき、通常生成する酸化還元剤は過酸化水素である。過酸化水素を製作したデバイスで定量的に検出することができるかを確認するためにデバイスのグルコースの検出に先立って、過酸化水素溶液を導入して電気化学反応を行わせた。それぞれの濃度の調整した過酸化水素溶液でキャピラリーセルを満たし、サイクリックボルタメトリーを行った。デバイス内の2つの電極間に、0から1000mVまでの電位をスキャンした時の電流値変化を図2に示す。図2に示すように、800mV付近の電流値は、過酸化水素由来の酸化電流が観測された。過酸化水素濃度と電流値の間で相対的な関係が認められ、製作したデバイスが過酸化水素検出用の電気化学セルとして機能することが判明した。同様の方法で今度は試料導入用の穴からグルコース溶液を導入する。キャピラリー内のGODによりグルコースが酸化され、このとき溶存酵素が過酸化水素になる。下記表1はこれら試料を導入した場合の応答値を表す。

【0047】

【表1】

測定対象物	デバイス単位	緩衝溶液 (pH 6.5)	グルコース溶液 (13mM)
電流値 ( $\mu\text{A}$ ) (300mV vs. 対極)	0.54	1.28	1.95

【0048】図3は本発明の第2の実施の形態によるグルコースセンサのガラス板を取り除いた状態を示す平面図である。図3に示すように、シリコン基板1上に、溝12が形成され、白金電極膜13、14が夫々形成されている。本発明の第1の実施の形態においては、溝数、即ち、キャピラリー数が16本であったが、第2の実施の形態によるものは、溝数72本と密度が高められている。また、そのために、電極取付部分も一対づつ並んで形成されている。

【0049】本発明の第1及び第2の実施の形態によるグルコースセンサは、その使用に際しては、白金電極膜にボルトンメータを備えた測定装置を接続したものを用意し、採血した血液を一滴、センサのキャピラリーに毛管現象によって吸い込ませて、測定すれば良い。

【0050】採血に際しては、例えば、消毒綿で指先を消毒し、乾燥させた後、採血器等を用いて穿刺して、血液を一滴しほりだす等が良い。

【0051】第2の実施の形態によるグルコースセンサも第1の実施の形態によるものと同様に、ガラス板を

重ねて両極接合して一体化した後、酵素固定化されても用いられる。

【0052】図4は本発明の第3の実施の形態によるグルコースセンサを示す分解組み立て斜視図であり、

(a)は第1のアクリル板、(b)は第2のアクリル板を示している。図4(a)を参照すると、第1のアクリル板21は、中央に孔部22を有し、一面23には、外周からこの孔部22に向かって断面角型の溝24が半径方向に複数設けられている。

【0053】図4(b)を参照すると、第2のアクリル板25は、表面に、先端部が直角に屈曲した白金電極27、28、29が、半径方向に途中で段を為し延在して夫々設けられている。この白金電極27、28、29は、スパッタリングによって形成され、この3本の電極27、28、29の内の電極28の基部は、この第2のアクリル板25の中心部付近で、中心電極30に夫々接続されている。

【0054】これらの第1及び第2のアクリル板21及び25は、図に示されている一面を、エチレンジアミン

のプラズマ重合によって処理され、互いに張り合わされたのち、後に詳しく述べるように、半径方向に形成されたキャピラリー内に誘導電極が固定化される。

【0055】図5(a)、図5(b)及び図5(c)は、図4(a)及び図4(b)の第1及び第2のアクリル板21及び25の一部を示す斜視図である。

【0056】図5(a)に示すように、厚さ2mm、半径30mm、内径20mmのドーナツ型の円板の一面に、深さ1mm、幅1mmの溝24が半径方向に複数本形成されている。

【0057】図5(b)に示すように、厚さ2mm、半径30mmの円板の一面で、溝24に対峙するように、半径方向に電極27、28、29が形成されている。この溝24は、電極の間方向に長い先端部27b、28b、29bが夫々横断する。

【0058】図5(c)に示すように、図5(a)の第1のアクリル板及び図5(b)の第2のアクリル板を図に示された一面を互いに合わせることに伴って、第1のアクリル板21の溝24は、第2のアクリル板25の一面によって、蓋がなされ、半径方向にキャピラリー31が形成される。

プラズマ重合条件

モノマー原料の流量	15 ml/min
温度	20 °C
圧力	$3.5 \times 10^{-2}$ Torr
放電電力	40 W
放電周波数	10 MHz FM変調
シャッター時間	60 sec

【0063】上記表2の条件で、プラズマ重合膜の成膜速度は、1000オングストローム/minであり、プラズマの重合膜の厚さは1000オングストロームである。

【0064】次に、具体的手順を説明する。

【0065】まず、図7(a)及び図8(a)に示すように、外径30mm、厚さ2mmのアクリル基板と外径30mm、内径20mm、厚さ2mmのアクリル板を用意する。図7(b)に示すように、アクリル板21の表面にキャピラリー形成用の溝24を機械加工により、半径方向に長さ10mm、深さ1mm、幅1mmの溝24を複数本形成する。図7(c)に示すように、アクリル板の一面にエチレンジアミンプラズマ処理によりアクリル基板表面にアミノ基を導入する。ここで、エチレンジアミンプラズマ重合膜の作製について、詳細に説明する。プラズマとは、電圧によってできた電子と正イオンがほぼ等しい密度となって全体として中性になっている物質の状態のことである。プラズマ重合法は、このプラ

【0059】次に、本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサーの製造方法について図6乃至図9を参照して説明する。

【0060】図6はプラズマ重合を行う装置の概略を示している。図6に示すように、装置は、装置本体50内の上部にサンプルステージ60が設けられ、その上にプラズマ発生器53が設けられている。プラズマ発生器53には、発振器52及び整合器51が接続されている。サンプルステージの下側のチャンバー内には、エチレンジアミン等の原料を蓄えるリザーバ59と、これに接続され、バルブを備えた配管からなる流路62と、流路62の一端に設けられた流量調整器58を介して、チャンバー内に導入管54が接続されている。

【0061】一方、チャンバー内のガスを排気するためには、チャンバー内には、拡散ポンプ56及びロータリーポンプ57に接続された排気管54が設けられている。この装置は、アミノ基導入のため、プラズマ重合膜のモノマー原料としてはエチレンジアミンを使用する。プラズマ重合の条件は、以下の表2の通りである。

【0062】

【表2】

ズマ中で重合し高分子合成を行う方法である。この方法あるいはこの方法で得られた膜は、(ア)どのようなモノマーでも製膜可能であること、(イ)ピンホールフリーの非晶質であること、(ウ)薄膜形成(～10nm)可能であり均質であること、(エ)膜形成だけでなく、プラズマガスの種類を変えることにより表面改質、修飾(例えば官能基導入)が可能であること、(オ)ドライプロセスであるので半導体技術との融合が容易であることなどの利点を備えている。

【0066】一方、図8(b)に示すように、アクリル板の一面に、図6に示した装置を用いるエチレンジアミンプラズマ処理によりアミノ基を導入する。

【0067】図8(c)に示すように、溝を形成していないアクリル基板上にスパッタリングによって白金電極パターン32を形成する。ここで、スパッタリングとは、素材の金属等をプラズマ状態にまで持っていき、対向する基板上に付着させる技術であり、主に電極形成用の金属薄膜に用いられるプロセスである。白金膜の付着



速度は、毎秒数オングストロームであり、膜厚は時間により制御可能である。ここでは、前記のアラズマ重合処理をしたアクリル基板の上にスパッタリングで白金電極を形成する。電極パターン作製にはメタルマスクを使用し、1対の電極パターン当たり3電極を夫々同時に形成

する。また、スパッタリングの条件は以下の表3の通りである、

【0068】

【表3】

スパッタリング条件	
温 度	20 ℃
アルゴンガス圧力	$3 \times 10^{-1}$ Pa
放 電 電 力	100 W
スパッタリング時間	10 min

【0069】上記表2の条件で、白金膜の成膜速度は100オングストローム/minであり、白金膜の厚さは1000オングストロームとなる。

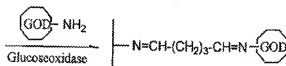
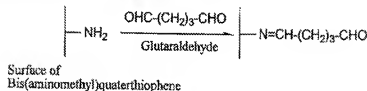
【0070】次に図9(a)に示すように、キャピラリー及び電極対を一体化させるため、基板間に1, 2-ジクロロエタンを塗布し、アクリル基板同士を溶接接合を行う。続いて、図9(b)に示すように、グルタルアルデヒドによって形成されたキャピラリー31内に酵素を

固定化する。

【0071】酵素固定化は、アラズマ重合膜表面にあるアミノ基と酵素に存在するアミノ基を二価の架橋試薬であるグルタルアルデヒドを用いて行う。この反応は、次の化3式で示される。

【0072】

【化3】



【0073】また、酵素固定化の詳細な手順は以下のように行う。

【0074】まず、(i) 2.5% (v/v) のグルタルアルデヒド (GA) を含むリン酸緩衝液 (pH 5.6) を用意し、前記のアラズマ処理を行ったキャピラリー内に塗布して30分放置する。(ii) これをリン酸緩衝液で洗浄後、1.0% (W/V) のGOTD (Type I, Sigma) を含むリン酸緩衝液を塗布したのち、30分室温で保持する。(iii) リン酸緩衝液で物理的吸着している酵素を洗い流す。

【0075】図10は、本発明の第3の実施の形態によるキャピラリー電極による過酸化水素の電極応答を示すサイクリックボルタモグラムである。図10において、横軸に電位E (mV)、縦軸に電流値 (A) を示している。

【0076】(a) の状態では、まったく電流が流れな

い、即ち、回路のショートがない。

【0077】(b) の状態では、400~800mVにおいて目立った電流変化が観測されない。

【0078】(c) の過酸化水素を入れると、300~800mVにおいて酸化電流が観測され、過酸化水素が検出できる事が分かる。測定条件等は図10に示されている通り、リン酸バッファ (pH 5.6) 2.0mM、走査速度 (Scan rate) 100mV/sec のCV測定で、室温 (27℃) により行われている。

【0079】図11は本発明の第3の実施の形態によるキャピラリー電極によるグルコースの電極応答のサイクリックボルタモグラムである。測定条件は図10と同様に行われており、溶液導入後3分後に測定を開始している。

【0080】図11に示すように、バッファ溶液のみの時では、目立った電流値が観測されないが、(d) グル

コースオキシダーゼ(GOD)によりグルコノラクトンと過酸化水素に変換され、この過酸化水素が検出できた事が分かる。また、このCV図での600mVにおける電流値の度合いを測る事によって、グルコースの定量が可能となる。

【0081】図12は本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサーのグルコース濃度による電流値変化(検量線)を示す図であり、図11において得られた最適な電位(600mV)におけるグルコース濃度を変化させた時の電流変化を示している。図12を参照すると、グルコース0~10mMの範囲において0~0.8μAの電流値変化が観測された。

【0082】ここで、この検量線は、電流値をYとくと以下の数1式のように示される。

【数1】

$$Y = -5.86 \times 10^{-7} - 7.34 \times 10^{-8} \times X \\ R = -0.94$$

【0084】図13は本発明の第3の実施の形態によるデバイスに設けられた任意の4つのキャビタリー(夫々G、H、I、Jと呼ぶ)を用いて、それぞれのキャビタリーによるグルコース濃度による依存性を測定した結果を示している。測定条件は、図12と同様に行った。

【0085】図13に示すように、それぞれ0~10mMのグルコース溶液において、0~1、5μAの範囲で変化していることが判る。

【0086】

【発明の効果】以上、説明したように、本発明では、マイクロマシン技術を用いることによって、シリコン基板とガラスとで構成されるマイクロ酵素反応キャビタリーと電気化学測定用電極を製作し、一体化及び集積化を行い、迅速かつ簡便であるという長所を持つバイオセンサーを微小化・一体化・集積化・量産化が可能なバイオセンサーシステムを構築することができ、さらに広い範囲に適用することができる酵素反応センサーとその製造方法とを提供することができる。

【0087】また、本発明においては、液体クロマトグラフ等の測定装置では、試料溶液の導入用にポンプなどの駆動系が必要となるが、システム中のデバイスはすべてキャビタリー構造が必要であり、この構造を持たせるために異方性エッチングによる溝を持つシリコン基板とガラスとの接合により得られるシリコンキャビタリーを採用し、シリコンキャビタリーを酵素反応カラムとしても用いることとしたので、キャビタリー自身が微小化による毛細管現象により試料輸送を担当し、内面の化学修飾により酵素を固定化することが可能となり、微量なグルコース溶液に対しても十分な応答を示したことから製作したデバイスがマイクロ酵素センサーとして機能する酵素反応センサーを提供することができる。

【0088】さらに、本発明によれば、単一のシリコンウエハー上に各々のデバイスを放射状に配列・多量のセンサーを組み込む事によって、各々のデバイスはディスプレイ型タイプのセンサーとして使用可能で、かつシリコンウエハー単位として組み込んだデバイスの数だけ連続使用可能な酵素反応センサーを提供することができる。

【0089】また、本発明によれば、プラスチック基板を用いているために、機械的な加工が容易であるとともに、製造コストの低廉化ができる酵素反応センサーを提供することができる。

【0090】また、本発明によれば、プラズマ重合処理を行っているために、基板同士の接合が容易であるとともに、酵素の固定化がさらに容易である酵素反応センサーを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】(a)は本発明の第1の実施の形態によるグルコースセンサーのガラス板とシリコンウエハーとの接合前の状態を示す分解組立斜視図である。(b)はグルコースセンサーの平面図である。

【図2】過酸化水素濃度と、電流値増加量との特性を示すグラフ、表は緩衝溶液およびグルコース溶液に対する電流値を示す図である。

【図3】本発明の第2の実施の形態による酵素反応センサーのガラス板とシリコンウエハーとの接合前の状態を示す平面図である。

【図4】本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサーを示す分解組立斜視図であり、(a)は第1のアクリル板、(b)は第2のアクリル板を示している。

【図5】(a)、(b)、及び(c)は図4(a)、(b)、に示したアクリル板21及び25の一部を示す斜視図である。

【図6】プラズマ重合を行う装置の概略を示す図である。

【図7】(a)、(b)、及び(c)は本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサーの製造方法を示す図である。

【図8】(a)、(b)、及び(c)は本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサーの製造方法を示す図である。

【図9】(a)及び(b)は本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサーの製造方法を示す図である。

【図10】本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサーのキャビタリー電極による過酸化水素の電極応答を示すサイクリックボルタモグラムである。

【図11】本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサーのキャビタリー電極による過酸化水素の電極応答を示すサイクリックボルタモグラムである。

【図12】本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサーのグルコース濃度による電流値変化(検量線)を

示す図である。

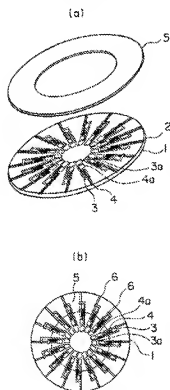
【図13】本発明の第3の実施の形態による酵素反応センサのキャピラリー（G, H, I, J）によるグルコース濃度による依存性を測定した結果を示す図である。

【符号の説明】

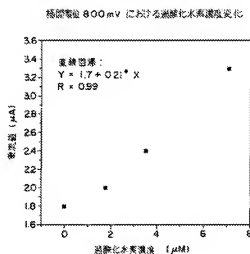
- 1 シリコン基板  
2 溝  
3, 4 白金電極膜  
3a, 4a 電極取出部  
5 ガラス板  
6 キャピラリー  
10 グルコースセンサー  
11 シリコン基板  
12 溝  
13, 14 白金電極膜  
13a, 14a 電極取出部  
21 第1のアクリル板  
22 孔部

- 23 一面  
24 溝  
25 第2のアクリル板  
27, 28, 29 電極  
30 中心電極  
50 チャンバー  
51 整合器  
52 発振器  
53 プラズマ発生器  
54 排気管  
55 導入管  
56 拡散ポンプ  
57 ロークリボン  
58 流量調整器  
59 リザーバー  
60 サンプルステージ  
61 導線  
62 流路

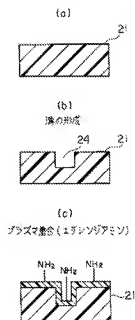
【図1】



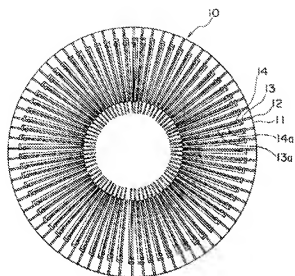
【図2】



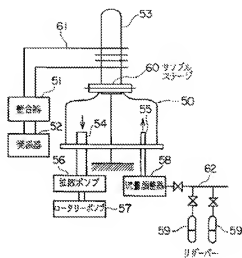
【図7】



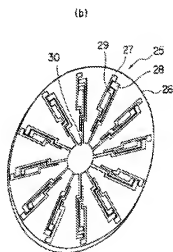
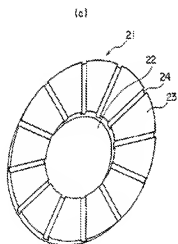
【図3】



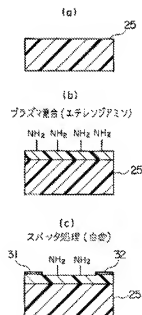
【図6】



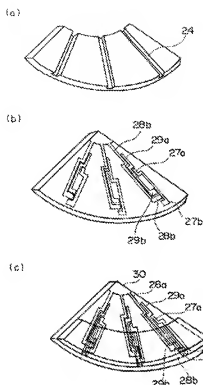
【図4】



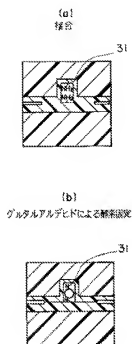
【図8】



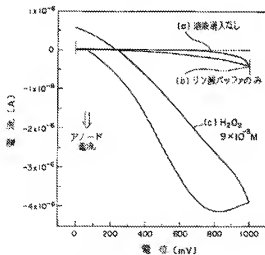
【図5】



【図9】

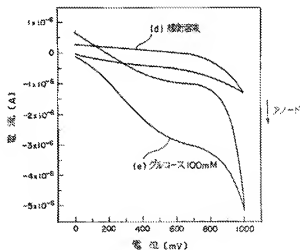


【図10】



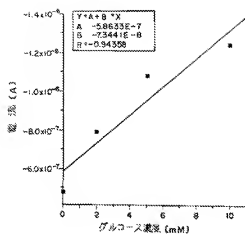
条件: リン酸バッファ (pH5.6) 20mM  
CV測定  
Scan rate 100mV/sec  
室温(27°C)測定

【図11】



条件: リン酸バッファ (pH5.6) 20mM  
CV測定  
Scan rate 100mV/sec  
溶液導入後、3分後、測定開始  
室温(27°C)測定

【図12】



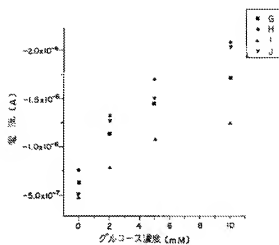
検量線

条件: CVによる+600mVにおける

電流値をプロット。

その他の条件は、CV高度(図11)と同じ

【図13】



・ 4本のキャピラリーそれぞれでの  
濃度依存性の検討 (G, H, I, J)

・ すべてのキャピラリーにおいて同じ条件(図12)と同じ